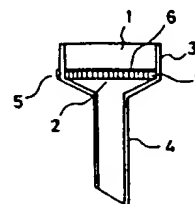


## (54) EASY ASSAY DEVICE

(11) 1-311273 (A) (43) 15.12.1989 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-140598 (22) 9.6.1988  
 (71) FUJIREBIO INC (72) AKIRA YANO  
 (51) Int. Cl. G01N33/537, G01N33/50

**PURPOSE:** To absorb a sample at a low rate at the time of reaction so that the efficient reaction with high sensitivity can be effected at the time of cleaning by absorbing liquid in a filter part where the reaction takes place and further allowing the liquid to flow down through said part in the state of filling the same in a flow passage.

**CONSTITUTION:** A reaction part 5 is disposed in a vessel 3 having a sample introducing port 1 and discharge port 2 and a liquid feed guide 4 is connected to the discharge port 2. The reaction part 5 is formed by bringing the hydrophilic filter 6 immobilized with a receptor or nuclear oligomer into tight contact with the top of a porous support 7 having water permeability. The filter characteristic of this reaction part 5 is such that the passage rate of the sample through the reaction part 5 is sufficiently low before the sample added from the introducing port 1 passes the reaction part 5 and fills said part up to the discharge port 2 and the passage rate is increased by the weight of the freshly added liquid.



## (54) IMMUNOASSAY

(11) 1-311274 (A) (43) 15.12.1989 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-141416 (22) 8.6.1988  
 (71) NITTO DENKO CORP (72) TAKASHI TSUJI(4)  
 (51) Int. Cl. G01N33/543

**PURPOSE:** To expand a determination region or to allow both of qualitative measurement and quantitative measurement by effecting a latex agglutination reaction and antigen-antibody reaction in combination.

**CONSTITUTION:** Water dispersion type high-polymer particles are used as a carrier and enzyme is conjugated together with an antigen or haptene or antibody onto this carrier. The latex agglutination reaction is effected by this enzyme labeled immune body conjugated latex and the specimen. The antigen-antibody reaction with the enzyme labeled immune body is then effected on the solid carrier previously conjugated with the antigen or haptene or antibody. The qualitative and quantitative measurements in a wide concn. region of the material to be examined are thus executed.

## (54) IMMUNOASSAY

(11) 1-311275 (A) (43) 15.12.1989 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-141417 (22) 8.6.1988  
 (71) NITTO DENKO CORP (72) TAKASHI TSUJI(4)  
 (51) Int. Cl. G01N33/543

**PURPOSE:** To enable the simple method using a water insoluble enzyme labeled immune body by dissociating the water insoluble enzyme labeled immune body as a reagent from a carrier at the time of bringing said immune body into reaction with a material to be inspected.

**CONSTITUTION:** An antigen or hapten or antibody labeled with enzyme is conjugated with the insoluble carrier conjugated with a material which can reversibly conjugate the enzyme. The enzyme labeled immune body is dissociated from the carrier by adding a dissociating agent thereto at the time of using the water insoluble enzyme labeled immune body obtd. in such a manner as the reagent and bringing the corresponding antigen or hapten or antibody as the material to be inspected into reaction. The simple measurement is thus executed.

⑩ 日本国特許庁(J.P.)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平1-311274

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成1年(1989)12月15日

G 01 N 33/543

C-7906-2G

F-7906-2G

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全7頁)

⑮ 発明の名称 免疫学的測定法

⑯ 特 願 昭63-141416

⑰ 出 願 昭63(1988)6月8日

⑱ 発 明 者 辻 孝 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電気工業株式会社内  
⑱ 発 明 者 森 健二郎 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電気工業株式会社内  
⑱ 発 明 者 渡 辺 哲 男 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電気工業株式会社内  
⑱ 発 明 者 吉 川 浩 志 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電気工業株式会社内  
⑲ 出 願 人 日東電工株式会社 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号  
⑳ 代 理 人 弁理士 牧野 逸郎  
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

免疫学的測定法

2. 特許請求の範囲

- (1) 水分散型高分子重合体粒子を担体とし、この担体上に抗原若しくはハプテン、又は抗体と共に、酵素が結合されてなる酵素標識免疫体結合ラテックスと被検液を混合して、ラテックス凝集反応を行なわせ、次いで、予め抗原若しくはハプテン、又は抗体を結合させた固相担体上で上記酵素標識免疫体と抗原抗体反応を行なわせることを特徴とする免疫学的測定法。
- (2) 酵素を結合し得る物質を結合させた水分散型高分子重合体粒子に酵素を標識した抗原若しくはハプテン、又は抗体を反応させて得られる酵素標識免疫体結合ラテックスを用いることを特徴とする請求項第1項記載の免疫学的測定法。
- (3) 酵素が糖鎖を有するタンパク質であり、酵素と結合し得る物質がレクチンであることを特徴とする請求項第2項記載の免疫学的測定法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、抗原抗体反応を利用する免疫学的測定法に関し、詳しくは、被検液中に含まれる抗原や抗体等のような同一の微量の被検物質について、ラテックス凝集反応と酵素免疫測定とを併せ行なうことができ、かくして、被検物質の測定の定量域を拡大し、又は定性的及び定量的測定の両方の測定を可能とする免疫学的測定法に関する。

従来の技術

抗原(又はハプテン)抗体反応の高い特異性と検出感度を利用して、抗原(又はハプテン)又は抗体(以下、免疫体ということがある。)を同定し、定量する方法として、従来より固相イムノアッセイ(免疫測定法)が知られている。この方法は、抗原(又はハプテン)又は抗体のいずれかを標識化してなる標識複合体を用いるものであつて、特に、標識複合体として放射能を有する物質を用いる固相ラジオイムノアッセイがよく知られている。この方法は、高感度であつて、広く実用化さ

れているが、反面、放射能同位元素の取扱いに厳重な規制が適用されるところから、近年においては、標識剤として酵素を用いる酵素免疫測定法が多く採用されるに至っている。

この酵素免疫測定法は、例えば、石川栄治著「酵素免疫測定法」(医学書院1987年発行)に記載されているように、種々の方法が知られているが、一般的には、ポリスチレンビーズ表面や試験管内壁面等、水不溶性固相担体の表面に、例えば抗体を固定し、これに測定すべき被検物質としての抗原を結合させ、次いで、この抗原に酵素標識抗体を結合させた後、未反応の酵素標識抗体を洗浄除去し、かくして、固相担体上に残存する標識酵素の量から測定すべき抗原の量を求める。上記標識酵素量は、例えば、酵素に対応する基質を反応させ、生成した反応生成物を光学的に定量することによって求めることができる。

この酵素免疫測定法は、高感度ではあるが、操作が煩雑であつて、測定に長時間を要し、また、過剰の被検物質に適用すれば、酵素標識した免疫

体が被検物質によつて消費され、見掛け上、反応量の低下、即ち、所謂ゾーン現象を生じる。更に、一般に、酵素標識免疫体は、低温で保存する必要がある等、保存上の問題もある。

他方、免疫学的測定法として、微粒子、特に、合成高分子ラテックス粒子を利用するラテックス凝集反応もよく知られている。この方法は、ラテックス粒子に抗原(又はハプテン)又は抗体を固定し、これを被検液と混合し、抗原抗体反応を生ぜしめて、ラテックス粒子を凝集させ、これを肉眼にて定性的に検出し、又は光学的に定量測定するものである。

この方法は、前述した酵素免疫測定法に比較して一般に、短時間で簡単に測定を行ない得るが、感度が悪く、高感度に被検物質を検出したい場合には、用いることができない。

#### 発明が解決しようとする課題

本発明は、従来の免疫学的測定法における上記した種々の問題を解決するためになされたものであつて、同一の被検物質について、ラテックス凝

集反応と酵素免疫測定とを併せ行なつて、定量域を拡大し、又は定性測定と定量測定の両方を可能とする免疫学的測定法を提供することを目的とする。

#### 課題を解決するための手段

本発明による免疫学的測定法は、水分散型高分子重合体粒子を担体とし、この担体上に抗原若しくはハプテン、又は抗体と共に、酵素が結合されてなる酵素標識免疫体結合ラテックスと被検液を混合して、ラテックス凝集反応を行なわせ、次いで、予め抗原若しくはハプテン、又は抗体を結合させた固相担体上で上記酵素標識免疫体と抗原抗体反応を行なわせることを特徴とする。

本発明の方法において、酵素標識免疫体結合ラテックスの調製に用いる水分散型高分子重合体粒子は、例えば、特開昭62-231171号公報に記載されているように、適宜の重合性単量体の乳化(共)重合によつて得ることができる。その粒子径は0.01~3 $\mu$ m程度であることが好ましい。

前記酵素標識免疫体結合ラテックスとしては、上記水分散型高分子重合体粒子に酵素及び免疫体の両者を結合してなるラテックスや、或いは上記水分散型高分子重合体粒子に酵素標識した免疫体を結合してなるラテックスが好適に用いられる。

酵素及び免疫体の両者を結合してなる前者の酵素標識免疫体結合ラテックスは、例えば、前記特開昭62-231171号公報に記載されているように、既に知られている。また、酵素標識免疫体を結合してなる後者の酵素標識免疫体結合ラテックスは、予め水分散型高分子重合体粒子に酵素と結合し得る物質を固定し、次いで、このラテックスに別に調製した酵素標識免疫体を反応させ、酵素標識免疫体を上記酵素と結合し得る物質によつてラテックスに結合することによつて得ることができる。ここに用いる酵素標識免疫体は、例えば、前記「酵素免疫測定法」等に記載されている方法に従つて調製することができる。

本発明において、上記酵素と結合し得る物質としては、レクチンが好適に用いられる。レクチン

としては、その酵素との結合能力を考慮して、コンカナバリンAやレンチルレクチンが特に好適に用いられる。よく知られているように、レクチンは、糖残基と可逆的に結合する能力を有しているので、酵素としては、糖鎖を含むタンパク質を用いることができる。従つて、化学的又は生化学的に糖鎖を修飾した酵素や、その他の酵素、例えば、酸性フォスファターゼ等を除外するものではないが、本発明の方法においては、酵素としては、酵素免疫測定法において汎用されているペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼが好ましく用いられる。

本発明において、前記水分散型高分子重合体粒子にレクチンを結合するには、重合体粒子を構成する単量体組成や、その表面が有する官能基等に応じて適宜の方法を採用すればよく、例えば、物理的に吸着させる方法や、化学的に結合させる方法等によることができる。かかる方法も、前記した特開昭62-231171号公報や、千畑一郎著「実験と応用アフィニティー・クロマトグラフ

イー」(講談社1976年発行)等に記載されている。

このようにして、水分散型高分子重合体粒子にレクチンを固定したレクチン結合ラテックスを調製し、これに糖の不存在下に過剰量の酵素標識免疫体を混合して、反応させた後、遠心分離等にて洗浄することによつて、酵素標識免疫体結合ラテックスを得ることができる。

本発明の方法においては、かかる酵素標識免疫体結合ラテックスを用いることによつて、同一の被検物質について、ラテックス凝集反応を行なわせると共に、予め免疫体を固定させた固相担体を用いて、酵素免疫測定を併せ行なうことができる。本発明による好ましい態様においては、かかるラテックス凝集反応と酵素免疫測定とを単一の試験管内で併せ行なう。

即ち、先ず、例えば、試験管の内面に、例えば、抗体を結合させ、この試験管内において、被検物質として抗原を含む被検液と前記酵素標識抗体結合ラテックスとを混合し、ラテックス凝集反応を

行なわせて、これを肉眼又は光学的手段によつて測定し、この後、所定時間、上記のようにして酵素標識抗体結合ラテックスに結合した抗原と前記固相上の抗体とを反応させて、抗原抗体反応を行なわせ、次いで、未反応の酵素標識免疫体を洗浄、除去し、更に、上記酵素に対応した基質を用いて酵素反応を行なわせることによつて、被検液に含まれる抗原を定量することができる。

尚、本発明においては、用いる上記ラテックス粒子の粒子径等にもよるが、上記ラテックス凝集反応の測定後、例えば、 $\alpha$ -D-マンノピラノースや $\alpha$ -D-グルコピラノース等を用いて、酵素標識抗体結合ラテックスにおけるレクチンと酵素との結合を解離させ、酵素標識抗体を生成させるのが有利な場合がある。

本発明においては、必要に応じて、予め抗体を結合していない試験管内で被検液と酵素標識免疫体結合ラテックスとを反応させ、ラテックス凝集反応を測定した後、この混合物を酵素標識抗体を結合した別の試験管に移し、ここで、前記した

ようにして、酵素免疫測定を行なつてもよい。

ラテックス凝集反応の検出や測定、酵素反応による被検物質の定量については、前記「酵素免疫測定法」に詳細に記載されている。

#### 発明の効果

以上のように、本発明の方法によれば、水分散型高分子重合体粒子からなる担体上に免疫体と酵素とが結合されてなる酵素標識免疫体結合粒子を用いることによつて、被検液中に含まれる同一の被検物質について、ラテックス凝集反応と酵素免疫測定を併せて行なうことができ、かくして、被検物質の広い濃度域での定性的及び定量的測定を行なうことができる。

#### 実施例

以下に実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

##### 実施例1

##### (a) ラテックス粒子の調製(i)

2,2,2-トリフルオロエチルメタクリレート1

0.0 g と、アクリル酸 4 g 及びスチレンスルホン酸ナトリウム 0.5 g を蒸留水 10 g に溶解させた水溶液とを蒸留水 380 g に加え、280 rpm にて攪拌しながら、80℃に昇温させた。これに過硫酸アンモニウム 0.5 g を蒸留水 10 g に溶解した水溶液を触媒として加え、攪拌下に6時間重合させた。

次いで、アルカリ、酸及び蒸留水の順序にて遠心洗浄による精製を行なった後、蒸留水に5重量%となるように再分散させて、カルボキシル化ラテックスを得た。このラテックス粒子は0.11  $\mu$ m の粒子径を有していた。

#### (b) ラテックス粒子の調製 (2)

スチレン 100 g と、アクリル酸 4 g 及びスチレンスルホン酸ナトリウム 0.05 g を蒸留水 10 g に溶解させた水溶液とを蒸留水 380 g に加え、280 rpm にて攪拌しながら、80℃に昇温させた。これに過硫酸アンモニウム 0.5 g を蒸留水 10 g に溶解した水溶液を触媒として加え、攪拌下に12時間重合させた。

量 5 ml として、それぞれ前記ラテックスに対応して、コンカナバリン A 結合ラテックスを得た。

#### (d) 酵素標識抗体の調製

ペルオキシダーゼ (シグマ社製、タイプ VI) 40 mg を蒸留水 10 ml に溶解させ、これにメタ過ヨウ素酸ナトリウム水溶液 (40 mg/ml) 0.5 ml を加え、室温で10分間攪拌した。

この溶液をセファデックス (Sephadex) G-25 に展開し、ペルオキシダーゼ溶液を分画し、水酸化ナトリウムにて pH を 9.5 に調整した。これに予め炭酸緩衝液 (pH 9.5、0.01 mol/l) にて透析した抗ヒト IgG 抗体 (ダコ (Dako) 社製、ウサギ IgG、10 mg/ml) 10 ml を加え、4℃にて24時間静置した後、水素化ホウ素ナトリウム (5 mg/ml) 1 ml を加え、4℃で2時間静置した。その後、トリス緩衝液 (pH 8.2、0.01 mol/l) にて透析し、セファクリル (Sephacryl) S-200 に展開して、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体を得た。

#### (e) 酵素標識抗体結合ラテックスの調製

次いで、アルカリ、酸及び蒸留水の順序にて遠心洗浄による精製を行なった後、蒸留水に5重量%となるように再分散させて、カルボキシル化ラテックスを得た。このラテックス粒子は0.32  $\mu$ m の粒子径を有していた。

(c) コンカナバリン A 結合ラテックス粒子の調製  
上記 (a) 及び (b) にて得たそれぞれのラテックス溶液 5 ml、ホウ酸緩衝液 (pH 7.5、0.1 mol/l) 2 ml 及び蒸留水 11 ml を混合し、これに1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩水溶液 (2 mg/ml) 2 ml を加え、10分後にコンカナバリン A (生化学工業製) 水溶液 (10 mg/ml) 5 ml を加え、10℃で24時間反応させた。

次に、それぞれの反応混合物に10重量%アルギニン水溶液 (pH 7.5) 5 ml を加えて、反応混合物中に残存する過剰の上記カルボジイミドを消費させ、1時間インキュベートした。この後、トリス緩衝液 (pH 8.2、0.01 mol/l) にて遠心洗浄を3回行なった後、同じ緩衝液に再分散させ、全

上で得たペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体溶液 10 ml と、前記コンカナバリン A 結合ラテックス溶液それぞれ 2 ml を混合し、室温で2時間攪拌、反応させた後、前記と同じトリス緩衝液を用いて遠心洗浄を2回行なった。この後、同じ緩衝液 2 ml に分散させて、それぞれペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体結合ラテックス 1 及び 2 を得た。

#### (f) 抗体感作プレートの調製

96穴マイクロプレート (タイターテック社製、EIA用) の各ウェルに抗ヒト IgG 溶液 (0.5 mg/ml、pH 7.0、0.1 mol/l リン酸緩衝液) 300  $\mu$ l を分注し、4℃にて1日間静置した。同じ緩衝液にて各ウェルを洗浄した後、ウシ血清アルブミン溶液 (1%、同緩衝液、アーマー社製) 300  $\mu$ l に置換し、37℃で2時間インキュベートした。更に、4℃で2日間静置した後、同緩衝液で洗浄し、抗ヒト IgG 感作プレートを得た。

#### (g) 測定

ヒト IgG 標準品 (ヘキスト社製) をトリス緩衝

液 (pH 8.2、0.01 mol/l、0.9%塩化ナトリウム含有) で希釈して、標準ヒトIgG溶液とした。

上記(i)にて調製した抗体感作プレートに上記標準ヒトIgG溶液100  $\mu$ lと、前記(ii)にて調製したラテックス溶液1及び2のそれぞれ100  $\mu$ l (トリス緩衝液 (pH 8.0、0.01 mol/l、0.9%塩化ナトリウム含有) にて希釈した。) とを混合し、室温で反応させ、100秒間における600 nmの吸光度変化をマイクロプレート・リーダーを用いて測定した。

更に、メチル- $\alpha$ -D-マンノシド (30 mM) 100  $\mu$ lを加え、室温にて2時間静置した。次いで、洗浄液 (トリス緩衝液、0.9%塩化ナトリウム及び0.2%BSA含有) で5回洗浄した後、酵素基質溶液 (リン酸-クエン酸緩衝液 (pH 6.0、0.01 mol/l、1 mM濃度の $\alpha$ -フエニレンジアミンと0.05%濃度の過酸化水素含有) 200  $\mu$ lを加え、室温で1時間反応させた後、硫酸緩衝液 (2N) 100  $\mu$ lを加えて、反応を停止させ、前記と同じリーダーにて495 nmの吸光度を測

定した。

#### (iv) 検量線の作成

上記(i)にて得た吸光度値を各濃度に相当する点でプロットし、前記ラテックス1及び2に対応して、それぞれ第1図及び第2図に示す検量線を作成した。これらから明らかなように、酵素免疫測定法において、抗原過剰領域での反応量低下 (ゾーン現象) の起こる定量域にてラテックス凝集反応を測定しており、広い定量域での測定を行なうことができる。

#### 実施例2

実施例1(ii)にて得たラテックス溶液5ml、ホウ酸緩衝液 (pH 7.5、0.1 mol/l) 2ml及び蒸留水11mlを混合し、これに1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩水溶液 (2 mg/ml) 2mlを加え、10分後にペルオキシダーゼ水溶液 (0.5 mg/ml) と抗ヒトIgG (4 mg/ml) の等量混合物5mlを加え、10℃で24時間反応させた。

次に、反応混合物に10重量%アルギニン水溶

液 (pH 7.5) 5mlを加えて、反応混合物中に残存する過剰の上記カルボジイミドを消費させ、1時間インキュベートした。この後、トリス緩衝液 (pH 8.2、0.01 mol/l) にて遠心洗浄を3回行なった後、同じ緩衝液に再分散させ、全量5mlとして、抗ヒトIgG-ペルオキシダーゼ結合ラテックス溶液3を得た。

実施例1(i)と同様にして、ラテックス凝集反応を行なった後、2時間室温で静置し、更に、洗浄した後、実施例1(ii)と同様にして、酵素活性を測定し、第3図に示す検量線を作成した。

第1図から第3図に明らかなように、酵素免疫測定法によれば、抗原過剰領域において吸光度の低下が観察され、みかけ上、実際の値より低い値に読み取られる濃度域がラテックス凝集反応によつてカバーされるので、正確な検体の定量が可能となる。

従来の酵素免疫測定法においては、ある吸光度を超える検体については、抗原過剰によるみかけ上の吸光度低下が起きているかどうかの判断が困

難であるため、一般に吸光度を越えない濃度まで検体を希釈し、定量値に検体の希釈率を乗じ濃度換算をする方法が採られている。しかしながら、そのような方法によれば、2度の測定操作を必要とし、煩雑である。また、本発明によれば、実用上、ラテックス凝集反応で定量される濃度域にある検体では、それに引き続く酵素免疫測定法の測定操作を省略すればよく、測定操作を極めて簡素化することができる。

更に、本発明によれば、第1図から第3図に明らかなように、ラテックスの種類を選択することにより、必要とされる定量域を適時変更することもできる。

#### 実施例3

実施例1にて調製した酵素標識抗体結合ラテックスと、比較対照として、同じく実施例1にて調製した酵素標識抗体とをそれぞれ40℃に保持して、酵素活性の経日変化を調べた。調製直後の酵素活性を100とする相対活性を第1表に示す。

第 1 表

	酵素の相対活性				
	直後	3日後	7日後	1月後	3月後
997721	100	100	98	96	90
997722	100	100	99	94	97
997723	100	100	100	97	93
対照	100	52	14	—	—

本発明において用いる酵素標識抗体結合ラテックスが保存性にすぐれることが明らかである。

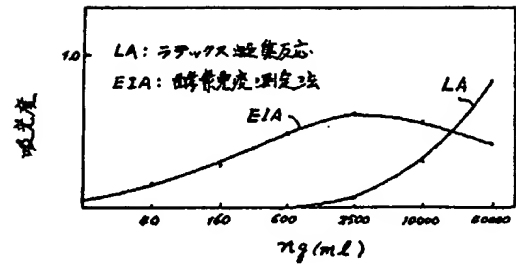
#### 4. 図面の簡単な説明

第1図から第3図は、それぞれ本発明に従ってラテックス凝集反応と酵素免疫測定とを併せ行なったときの被検物質の濃度の検量線を示すグラフである。

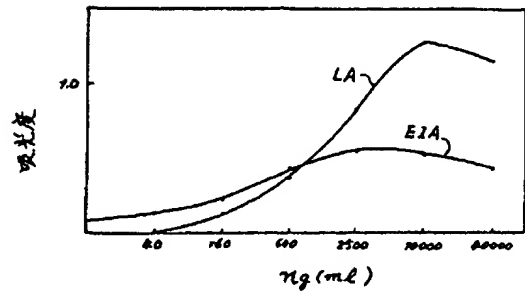
特許出願人 日東電気工業株式会社  
代理人 弁理士 牧 野 逸 郎



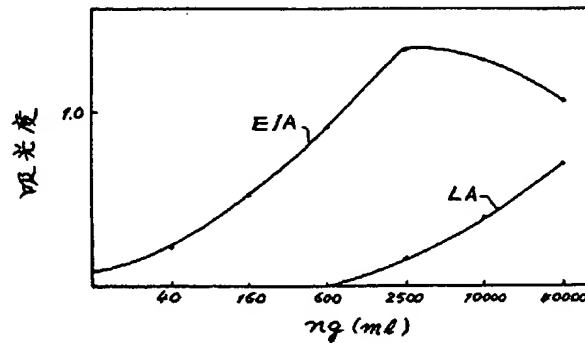
第1図



第2図



第3図



第1頁の続き

②発明者 木原 康夫 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東電気工業株式会社内